

На правах рукописи



АРТЮШИН
Илья Витальевич

ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ КОЖАНОВ
РОДА *EPTESICUS* ВОСТОЧНОЙ ПАЛЕАРКТИКИ

03.02.04 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена на кафедре зоологии позвоночных биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Банникова Анна Андреевна

Научный консультант: кандидат биологических наук
Крусков Сергей Вадимович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Холодова Марина Владимировна
«Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова», заведующая кабинетом методов молекулярной диагностики.

доктор биологических наук
Ильин Владимир Юрьевич
«ФГБОУ Пензенский Государственный Университет» (ПГУ), заведующий кафедрой зоологии и экологии
**Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург**

Ведущая организация:

Защита состоится 20 мая 2013г. в 17 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.20 при биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, ауд. М-1

Тел/факс: +7 (495) 939-43-09;

E-mail: irbeme@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного Университета им. М.В. Ломоносова

автореферат разослан ___ апреля 2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор
И.Р. Беме



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Стремительное усиление роли молекулярных исследований во всех отраслях биологической науки обуславливает новые достижения в области филогенетики, филогеографии, популяционной генетики и объясняет появление огромного разнообразия конкурирующих гипотез относительно эволюционной истории различных групп организмов. Одно из заметных последствий процесса экспансии молекулярных методов в зоологию – это дальнейшее развитие и усиление генетической концепции вида (Bateson, 1909; Dobzhansky, 1934; Muller, 1939; Bradley, Baker, 2001; Baker, Bradley, 2006), которой придерживается автор данной работы. Согласно генетической концепции, вид — это совокупность генетически совместимых популяций, которые генетически изолированы от других подобных совокупностей, а видообразование определяется как процесс накопления генетических различий между двумя филогенетическими линиями, приводящий к генетической изоляции двух генных пулов, имеющих каждый свою собственную эволюционную судьбу.

Понимание филогенетических взаимоотношений летучих мышей семейства гладконосых (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) всегда вызывало затруднения из-за очевидного эволюционного и экологического успеха группы (с точки зрения видового разнообразия и биогеографии) при ограниченности морфологической диверсификации. Параллельная или конвергентная эволюция многих морфологических признаков приводят к заблуждениям относительно эволюционной истории Vespertilioninae (Arnback-Christie-Linde, 1909; Ellerman, Morrison-Scott, 1951; Hill, Harrison, 1987; Hill, Topal, 1973; Koopman, 1975; Rosevear, 1962; Tate, 1942; Volleth, Heller, 1994; Zima, Nogasek, 1985 и др.), что, в свою очередь, затрудняет построение естественной и объективной классификации семейства. Использование молекулярных методов для исследования семейства Vespertilionidae принесло новое понимание филогенетических взаимоотношений между существующими видами. Оно привело к выявлению большого числа криптических форм, чей статус, вследствие противоречий между уровнем генетической и морфологической дивергенции, стал предметом дискуссий среди систематиков. (Mayer, Helversen, 2001; Helversen, Heller 2001; Ibanez et al., 2006; Matveev et al., 2005; Mayer et al., 2007; García-Mudarra et al., 2008; Juste et al. 2010; Salicini et al., 2011; Salicini et al., 2012).

Род настоящих кожанов (*Eptesicus*) – один из центральных родов семейства, особенно важен для понимания систематики Vespertilionidae в целом. Он обладает практически всеветным распространением, включает значительное число видов, некоторые из которых обладают обширными ареалами и выраженной географической изменчивостью (Simmons, 2005). При этом границы и состав рода неоднократно пересматривались (Heller, Volleth, 1984; Kitchener et al., 1987; Hill, Harrison, 1987; Csorba, Lee, 1999; Hooper, Van Den Bussche, 2003; Roehrs et al., 2010; Roehrs et al., 2011), а родст-

венные взаимоотношения видов в течение длительного времени оставались противоречивыми (Morales et al., 1991).

Для понимания структуры рода важный вопрос представляют собой взаимоотношения широко распространенных в Палеарктике видов: позднего кожана *E. serotinus* и северного кожанка *E. nilssonii*. Ранее (Mayer, Helversen, 2001) было указано на невозможность разделения по мтДНК этих хорошо различимых морфологически и весьма далёких с точки зрения классической систематики видов в западноевропейской части ареала. Это привело к появлению двух альтернативных гипотез, до сих пор нуждающихся в проверке: (1) интрогрессивная гибридизация или (2) быстрая морфологическая эволюция одного из видов за время, недостаточное для полной сортировки митохондриальных линий. Одновременно была показана глубокая митохондриальная гетерогенность *E. serotinus* (Ibanez et al., 2006), однако, популяции *E. serotinus* с территории Восточной Европы, Сибири и Средней Азии в генетическом отношении оставались не изученными. Генетические данные об относительно узкоареальных формах *E. bobrinskoi*, *E. gobiensis*, *E. bottae ognevi*, населяющих аридные районы Средней и Центральной Азии (Кузякин, 1950; Крускоп, 2012) также отсутствовали.

Цель исследования состоит в оценке генетической изменчивости видов рода *Eptesicus* на основании нескольких независимых генетических локусов уделив отдельное внимание генетической структуре *E. serotinus ssp.* и *E. nilssonii* в восточноевропейской и азиатской частях ареала и установлении филогенетических отношений этих видов с близкородственными видами кожанов.

Для решения этих вопросов поставлены следующие **задачи**:

1. На основе данных анализа мтДНК оценить видовое и внутривидовое разнообразие рода *Eptesicus*, проанализировать географическую изменчивость широко распространенных видов.

2. Выявить несоответствия между принятой таксономической системой и наблюдаемой структурой генетического разнообразия рода *Eptesicus*.

3. На основании изучения митохондриальных и ядерных маркеров проанализировать уровень дивергенции и характер взаимоотношений между признаваемыми географическими формами *E. serotinus*, ревизовать их таксономический статус.

4. На основании митохондриальных и ядерных генов проанализировать возможные причины сходства мтДНК позднего кожана *E. serotinus* и северного кожанка *E. nilssonii* в европейской части ареала.

5. На основе всех имеющихся генетических данных предложить гипотезу о филогенетических взаимоотношениях между видами рода *Eptesicus*.

Научная новизна. Предложена новая молекулярно-филогенетическая гипотеза взаимоотношений внутри рода *Eptesicus* на основе анализа митохондриальной и ядерной ДНК. Результаты работы указали на ненадежность филогенетических реконструкций в данной группе, основанных исключительно на мтДНК. На основе анализа как митохондриальных, так и ядерных генов

впервые получены данные в пользу конспецифичности *E. bobrinskoi* и *E. gobiensis*, выдвинуто предложение о необходимости ревизии *E. bottae ognevi* и *E. serotinus andersoni*, показано, что выделение подрода *Amblyotus* не поддерживается генетическими данными. Новые данные о генетической изменчивости подвидов *E. serotinus* не подтверждают видового статуса *E.s. turcomanus*. Впервые на основе митохондриальной и ядерной ДНК получены убедительные подтверждения древней межвидовой гибридизации в пределах изучаемого рода, что дает материал для интерпретации ряда других таксономически неоднозначных ситуаций.

Теоретическая и практическая ценность работы. Проведенные исследования финансировались Российским Фондом Фундаментальных Исследований (№08-04-00029, №10-04-00683, №11-04-000200) и соответствуют задачам этого фонда. Работа имеет теоретическое значение для познания процессов формирования биоразнообразия и закономерностей микроэволюции. Результаты данного исследования вносят вклад в понимание многообразных и сложных факторов видообразования и явления интрогрессии у млекопитающих. Внутривидовая и внутривидовая систематика летучих мышей рода *Eptesicus*, базирующаяся на немногих морфологических признаках, теперь может быть проверена на основе молекулярно-генетических данных. Полученные новые данные по генетическому разнообразию и молекулярной систематике кожанов обуславливают необходимость таксономической ревизии рода *Eptesicus* и должны быть использованы в этих целях.

Результаты работы могут быть применены в практических мероприятиях, использующих данные таксономических исследований и сведения по инвентаризации фауны (при составлении кадастров, разработке стратегии и тактики охраны генофондов, проведении экологического мониторинга и т.п.)

Апробация работы. Основные результаты работы обсуждались на лабораторных семинарах и заседании кафедры зоологии позвоночных Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова и доложены на конференциях: «Современные проблемы зоо- и филогеографии млекопитающих» (Пенза, 2009), «Целостность вида у млекопитающих (изолирующие барьеры и гибридизация)» (Петергоф, 2010), «IX Съезд Териологического общества при РАН» (Москва, 2011), 15th IRBC (Прага, 2010), ESM '12 (Париж 2012).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов, заключения и библиографического списка. Работа иллюстрирована 7 таблицами, 35 рисунками. Список литературы включает 160 наименований, в том числе 145 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность темы, поставлены цели и задачи исследования.

Глава 1. Изменчивость и систематика и рода *Eptesicus* и проблема исторической гибридизации (обзор литературы).

В разделе I главы приведен обзор изменения представлений о составе и разнообразии рода *Eptesicus* и обсуждается современное состояние проблемы на основе морфологических и молекулярных данных. Раздел II посвящён проблемам интрогрессивной гибридизации в природе преимущественно на примере млекопитающих. В разделе III приводится обзор молекулярных маркеров, использовавшихся ранее для решения филогенетических проблем у рукокрылых и краткий обзор методик, применяющихся для изучения интрогрессивной гибридизации.

Глава 2. Материал и методы.

Материал исследования.

Оригинальным материалом для данного исследования послужили 114 особей летучих мышей, из них 66 особей *E. serotinus*, 27 особей *E. nilssonii*, 2 *E. bottae ognevi*, 7 *E. gobiensis*, 6 *E. bobrinskoi*, 2 *Scotimanus ornatus*, 2 *Arielulus circumdatus*, а также по одной особи *E. fuscus* и *E. furinalis*. Для исследования использовали мышцы и органы зверьков, фиксированные в 96% этаноле. Заспиртованные тушки исследованных летучих мышей хранятся в коллекциях Зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва) и Зоологического института РАН (Санкт – Петербург). Часть образцов в виде спиртовых препаратов тканей была любезно предоставлена Д.Г. Смирновым (ПГПУ, Пенза), В.А. Матвеевым, С.В. Крускопом (ЗМ МГУ, Москва), В. Росиной (Палеонтологический Институт РАН, Москва) и А.В. Борисенко (Королевский Музей естественной истории Онтарио), А.С. Голенко (Центр реабилитации рукокрылых, Киев). Образцы из окрестностей посёлка Мирное Туруханского района Красноярского края, посёлка Олень, хутора Ерецкий, посёлка Клетский Волгоградской области и села Солодники Астраханской области, посёлка Нижнебаканский Краснодарского края, деревни Ляличи, Брянской области, из северо-западного Казахстана и Узбекистана, собраны мною лично в полевые сезоны 2007-2011 г.

Также были использованы последовательности из базы «GenBank» и данные проекта «BOLD», любезно предоставленные С.В. Крускопом.

Выделение, амплификация и секвенирование ДНК.

Для молекулярно-генетического анализа использовали митохондриальный ген цитохрома b (*cytb*), три ядерных экзона: экзон 29 аполипопротеина В (APO), *dentin matrix acidic phosphoprotein gene* (DMP), фрагмент гена активации рекомбинации (RAG2), и два интрона: интрон 2 с фрагментом экзона 3 β-цепи гена предшественника тиротропина (Thy), 12-й интрон с фрагментом 13-го экзона незритроидного бета-спектрина 1 (*sptbn*).

Геномную ДНК выделяли из фиксированных этанолом мышц и печени стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации (Sambrook и др., 1989). Для амплификации и секвенирования были использованы праймеры: для фрагментов гена *cytb* L14734 - (Ohdachi и др., 2001), L486, H602, H15395_pip (Artyushin et al., 2009); для ядерных генов *Thy* и *sptbn* соответствующие праймеры из статьи Eick et al. (2005). Для RAG2 — RAG2_F1, RAG2_R2 (Baker, 2000). Для генов APO и DMP1 (и дополнительно для *sptbn* и RAG2) были разработаны оригинальные праймеры. ПЦР амплификацию проводили на приборах My Cycler BioRAD и ТЕРЦИК. Автоматическое секвенирование проведено на секвенаторе ABI 3100-Avant с использованием ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 в лаборатории ЦКП «ГЕНОМ».

Для ограниченной выборки проводили inter-SINE PCR анализ с олигонуклеотидами *mir17*, *mil17*, *omir17* и *omil17* (Jurka 1995).

Обработка данных молекулярно-генетического анализа.

Полученные последовательности выравнивали вручную. Реконструкция филогенетических деревьев была выполнена по методу максимального правдоподобия (ML) и максимальной экономии (MP) в программах PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 1998) и TREEFINDER (Jobb, G. TREEFINDER version of March 2011. 2011. Munich, Germany). Также проводили байесовский анализ с помощью программы MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003; Altekar et al., 2004). Схемы разбиения на партии и модели для ML и BA были определены в PartitionFinder v1.0.1 (Lanfear et al., 2012). Для построения супердерева использовался метод MRP (Baum, 1992; Ragan, 1992; Baum, Ragan, 1993) на основе результатов ML анализа по отдельным генам.

Реконструкцию аллельных фаз для генов *Thy* и *sptbn* проводили с использованием Байесова метода в программе PHASE 2.1 (Stephens et al., 2001; Stephens and Donnelly, 2003). Для полученных аллелей строили парсимониальную сеть в программе TCS v1.21 (Clement et al., 2000). Был проведён NJ дистанционный анализ матрицы реконструированных аллелей в программе MEGA 5 (Tamura, 2011). В среде R (R Core Team, 2012) проводили многомерное шкалирование матрицы дистанций для аллелей и усреднённых дистанций между особями.

Анализ главных координат по матрице NET-дистанций между популяциями был выполнен в NTSYSpc 2.20 (Rohlf, 2008).

Глава 3. Результаты

Анализ митохондриального гена *cytb*.

В итоговое выравнивание вошло 146 последовательностей. Его длина составила 707 п.н. после приведения к длине последовательностей, доступных в БД «GeneBank». Также для анализа использовали 66 полных последовательностей длиной 1140 п.н.

По результатам анализа митохондриальной ДНК выделяется не менее семи группировок (рис. 1). Последовательности *E. s. serotinus* вместе с *E. s. turcomanus* распадаются на две группы: (1) *E. s. serotinus* с территории Запад-

ной Европы объединяются с образцами *E. nilssonii*, причем *E. nilssonii* парафилетичен относительно западно-европейских *E. serotinus*: в одну из его подгрупп попадают гаплотипы из Западной Европы и с запада Европейской части России, в другую - гаплотипы с Урала и из Сибири. В этот западно-европейский кластер *nilssonii/serotinus* также попадают три из шести гаплотипов из Брянской области, один из Калининградской и три из четырёх из окрестностей Киева (2) Остальные последовательности *E. serotinus* из Восточной Европы и все, полученные с территории Средней Азии образуют отдельную ("южную") ветвь.

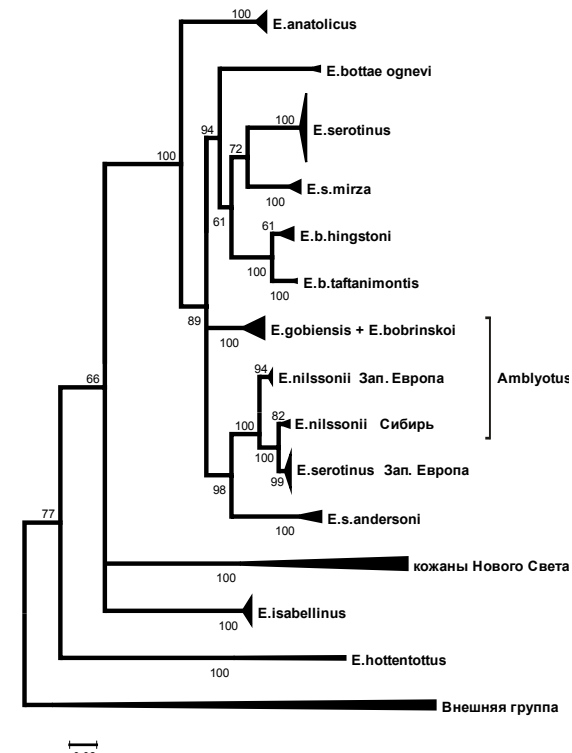


Рис.1. Филогенетическое древо, построенное в результате Байесова анализа по данным гена *cyt b* (707 п.н.). В узлах указаны апостериорные вероятности для соответствующих ветвей.

E. s. mirza является сестринской группой к "южной" ветви *E. serotinus*.

E. s. andersoni является сестринской группой *E. nilssonii* и отделён значительными дистанциями от остальных гаплотипов *E. serotinus* ssp.

Комплекс *E. bottae* не монофилетичен: последовательности *E. anatolicus* (ранее *E. b. anatolicus*) оказываются базальными относительно всех палеарктических кожанов, за исключением *E. isabellinus*, подвиды *E. b. ognevi*, *E. b. hingstoni*+*E. b. taftanimontis* образуют сестринскую группу с *E. s.*

serotinus+*E. s. mirza*. Дистанции между *E. b. ognevi*, и ветвью *E. b. hingstoni*+*E. b. taftanimontis* высоки и достигают видового уровня (7,7%). Положение монофилетической группировки *E. gobiensis*+*E. bobrinskoii* внутри клады европейских кожанов не определено, причем оба вида в составе этой группировки не монофилетичны, их гаплотипы разделены крайне низкими дистанциями.

Кожаны Нового Света (*E. fuscus*, *E. furinalis*), кожаны из Южной Испании (*E. isabellinus*), и южноафриканский вид *E. hottentotus* образуют три самостоятельные ветви, на митохондриальном дереве отделившиеся от общего ствола раньше палеарктических *Eptesicus* spp.

Для уточнения положения ветви кожанов Нового Света был проведён дополнительный анализ объединённых данных для митохондриальных генов *cytb* и *ND1* (последний из БД «GeneBank»), который показал наиболее раннее отделение этой ветви в радиации группы. Отделение *E. hottentotus* — наиболее ранняя дивергенция среди кожанов Старого Света.

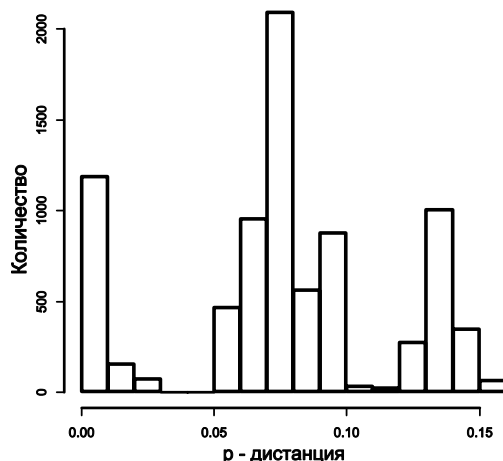


Рис. 2. Гистограмма распределения попарных невзвешенных p-дистанций (ген *cytb*)

Распределение попарных p-дистанций (рис. 2) имеет выраженный мультимодальный характер. Первая группа (0-4%) соответствует внутривидовым дистанциям, также в эту группу попадают дистанции между западноевропейской группой *E. serotinus* и обеими ветвями *E. nilssonii* и дистанция между *E. gobiensis* и *E. bobrinskoii*. Во вторую (4-11%) попадают дистанции между большинством видов, кроме *E. isabellinus*, *E. hottentottus* и видов Нового Света. Третью группу составляют дистанции между *E. isabellinus*, *E. hottentottus*, видами Нового Света и остальными группами. Дистанции между *E. s. mirza* и "южной" гаплогруппой *E. serotinus* не укладываются в диапазон внутривидовых и находятся на нижней границе межвидовых.

Анализ ядерных данных ТНУ

Для анализируемой выборки (24 экз. *E. nilssonii*, 6 – *E. gobiensis*, 4 – *E. bobrinskoii*, 54 – *E. serotinus*, 5 – *E. s. andersoni*), программа PHASE реконструировала наибольшее количество аллелей для *E. nilssonii* – 11, и для *E. serotinus* – 10. Из трёх аллелей *E. gobiensis* – два общие с *E. bobrinskoii*. Три аллеля из пяти у *E. bobrinskoii* – уникальные. У *E. s. andersoni* найдено 3 аллеля. Топология парсимониальной сети, построенной по реконструированным аллелям (рис. 3), лишена циклов и большинство связей соответствует единичным заменам. Аллели *E. serotinus* составляют два подграфа (гаплогруппы ТА и ТВ), которые связаны между собой и с группой гаплотипов *E. nilssonii* через гаплотип *E. s. anderssoni*.

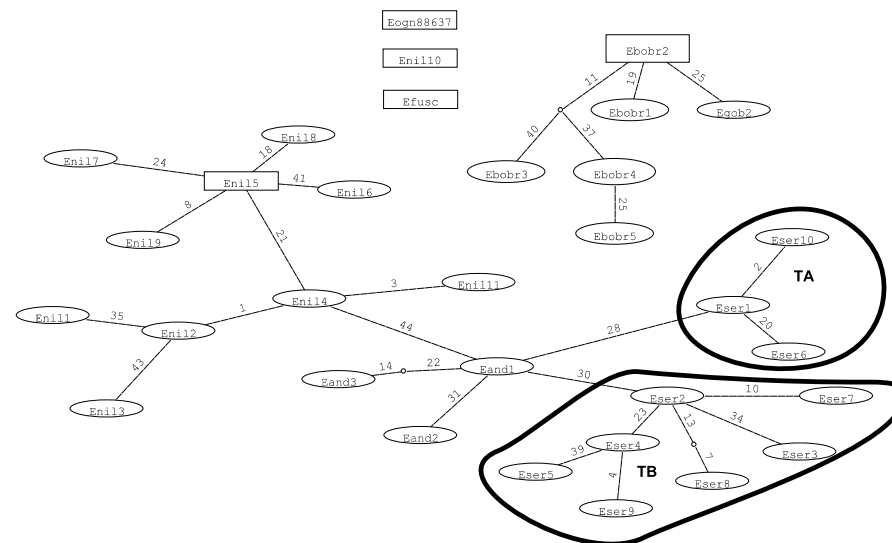


Рис. 3. Парсимониальная сеть, отображающая разнообразие аллелей ТНУ. Частоты аллелей не указаны, каждое ребро соответствует одной замене. Числа над ребрами графа показывают положение замен в выравнивании переменных позиций.

Для анализа географической изменчивости гена ТНУ выборка *E. serotinus* была подразделена на 8 географических подвыборок. Распределение частот встречаемости аллелей демонстрирует переход от доминирования группы ТА на востоке исследованной территории к преобладанию группы ТВ на западе (рис. 4).

Метод главных координат (PCA), применённый к матрице NET-дистанций между географическими подвыборками *E. serotinus* располагает их

вдоль оси (ТНУ_e1), соответствующей долготному распределению локалитетов (рис. 5). Расстояние в пространстве главных координат между восточными подвыборками ("Астрахань", "Казахстан") и подвыборкой "Волгоград" оказывается непропорционально большим относительно географических дистанций.

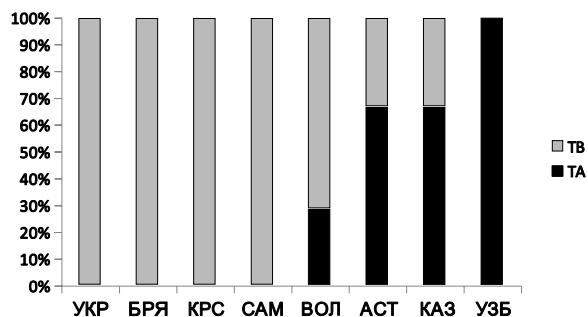


Рис. 4. Географическое распространение гаплогрупп ТНУ. Ось категорий – географические подвыборки (слева направо: «Узбекистан», «Казахстан», «Астрахань», «Волгоград», «Самара», «Краснодар», «Брянск», «Украина»). Ось значений – относительная частота гаплогрупп.

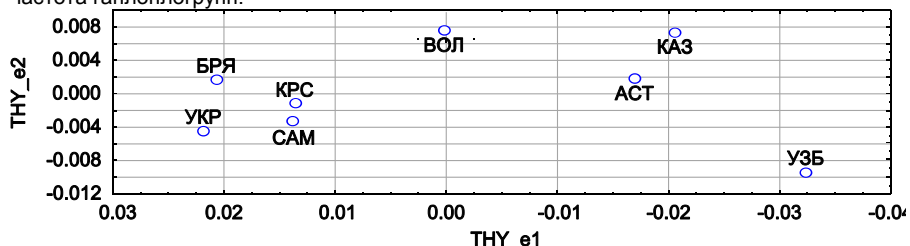


Рис. 5. Размещение выборок в главных координатах по данным NET-дистанций между последовательностями гена ТНУ. Обозначения подгрупп соответствуют обозначениям на рис. 4.

SPTB

Для анализируемой выборки (*E. nilssonii* - 18 экз., *E. serotinus* - 47 экз., *E. bobrinskoi* и *E. gobiensis* - по 6 экз.) в программе PHASE было реконструировано 23 аллеля *E. nilssonii*, 30 аллелей *E. serotinus* - 4 и 5 аллелей для *E. bobrinskoi* и *E. gobiensis* соответственно, причём один аллель *E. gobiensis* совпадает с аллелем *E. bobrinskoi*.

Парсимониальная сеть гаплотипов SPTB имеет более сложную топологию, чем для гена ТНУ, и отличается от неё наличием циклических связей (рис. 6). Граф распадается на несколько несвязанных сегментов: сегмент, включающий большинство аллелей *E. nilssonii*, три отдельных сегмента, состоящих из аллелей *E. serotinus* (SA, SB, SC), два сегмента для *E. bobrinskoi*+*E. gobiensis*. Эти сегменты соответствуют слабо- и умеренно-поддержанным кластерам на NJ дереве (не приводится).

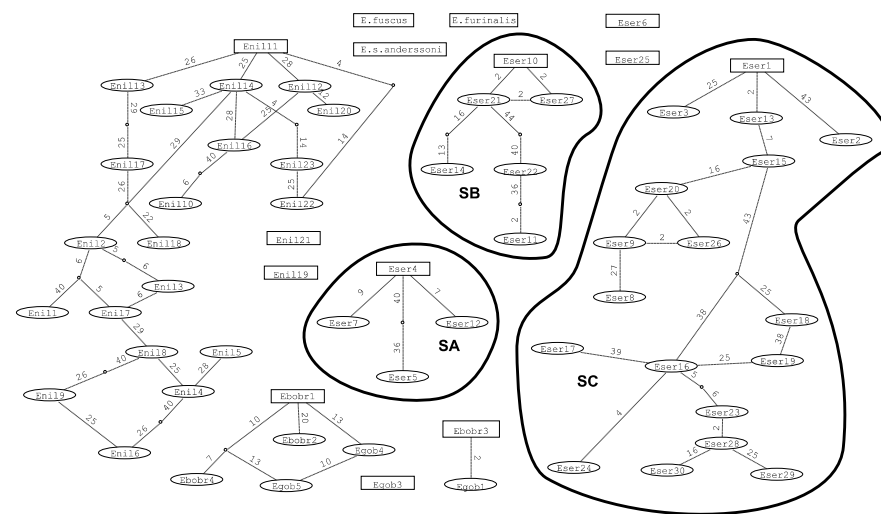


Рис. 6. Парсимониальная сеть, отображающая разнообразие аллелей SPTB. Частоты аллелей не указаны, каждое ребро соответствует одной замене. Числа над ребрами графа показывают положение замен в выравнивании переменных позиций.

Географическое распределение (рис. 7.) аллелей из гаплогрупп *E. serotinus* так же демонстрирует переход от преобладания одной из групп (SC) в восточных популяциях к преобладанию других (SA, SB) в западных.

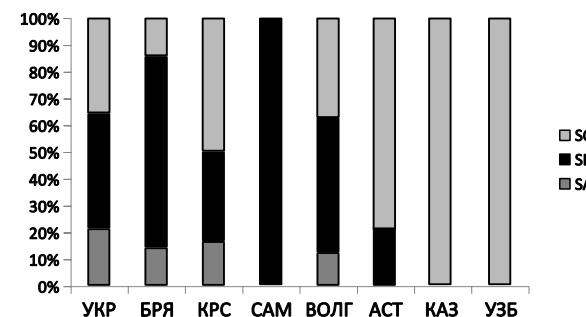


Рис. 7. Географическое распространение гаплогрупп SPTB. Ось категорий - географические подвыборки, ось значений – относительная частота гаплогрупп.

Расположение выборок при анализе последовательностей интрона SPTB в пространстве двух осей хуже соответствует географическим дистанциям между подвыборками, чем таковое для интрона ТНУ. Однако остаётся верным утверждение об относительно удалённом расположении друг относительно друга восточной ("Казахстан", "Узбекистан", "Астрахань") и западной ("Украина", "Краснодар", "Брянск") группы выборок. Выборка "Волгоград"

оказывается внутри западной группы, что противоречит её географической близости к подгруппе "Астрахань" (рис. 8.).

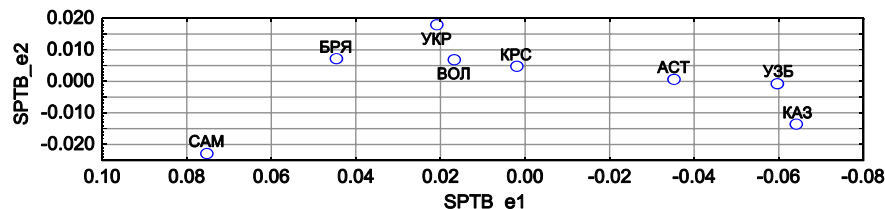


Рис. 8. Размещение выборок в главных координатах по данным NET-дистанций между последовательностями гена SPTB. Обозначения подгрупп соответствуют обозначениям на рис. 4.

NJ анализ с бутстрэп-процедурой матрицы NET-дистанций (рис. 9) с высокой степенью статистической поддержки восстанавливает восточную ("Казахстан", "Узбекистан", "Астрахань") и западную ("Украина", "Краснодар", "Брянск") группу подвыборок, объединяя "Волгоград" с западной.

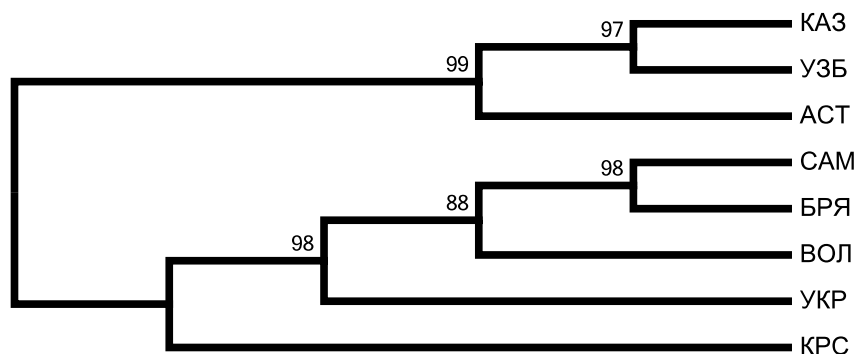


Рис. 9. NJ дерево по матрице NET-дистанций между географическими подвыборками *E. serotinus*. В узлах указаны бутстрэп поддержки (1000 реплик). Обозначения терминальных ветвей соответствуют кодам географических подвыборок.

Анализ данных по пяти ядерным генам.

В объединённое выравнивание по ядерным генам (4058 п.н.) вошли 56 последовательностей. (АРОВ — 705 п.н., DMP1 — 962 п.н., RAG2 — 1285 п.н., SPTBN — 544 п.н., Thy — 562 п.н.)

Все деревья, построенные методами MP, ML, MB на объединённых данных по ядерным генам, содержат 5 основных клад:

1. к1. Кожаны Нового Света, включая род *Histiopus* (клада "fuscus");
2. 2. *E. serotinus* ssp. вместе с *E. s. andersoni* и *E. isabellinus*, ранее входивший в качестве подвида в *E. serotinus* (клада "serotinus");
3. Е3. *E. bottae ognevi* и *E. hottentotus* - (клада "hottentotus/bottae");
4. г4. Группа *E. gobiensis/E. bobrinskoi* - клада "gobiensis";
5. Е5. *E. nilssonii* - клада "nilssonii";

Две последние клады, не объединяются в общий кластер, однако разделены наименьшими генетическими дистанциями.

Общий анализ оригинальных и доступных в GeneBank (Juste et al 2010) последовательностей гена RAG2 поддерживает объединение *E. b. bottae* и *E. anatolicus* в общую группу, а также, хотя и с низкими поддержками, но объединяет *E. serotinus* ssp.

В целом филогенетические отношения между найденными на ядерном дереве пятью группами не являются разрешёнными.

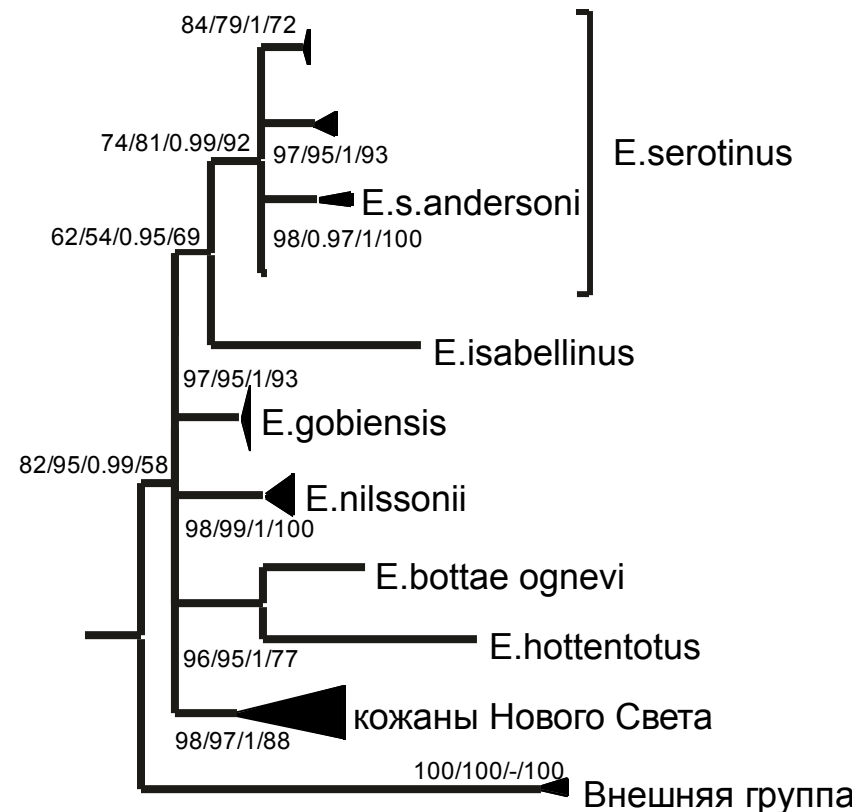


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное методом ML по конкатенированным ядерным данным (3.9 тыс. п.н.). В узлах указаны поддержки ML/MP/BPP/бутстрэп поддержки для супердерева (MRP).

Глава 4. Обсуждение

Митохондриальная филогения рода.

Полученная нами топология митохондриального филогенетического дерева (рис. 1) не полностью соответствует принятому таксономическому делению рода на уровне видов.

Общая структура дерева и распределение попарных дистанций заставляют предположить два этапа радиации в пределах рода. Во время первого из них происходит обособление южно-африканской (*E. hottentotus*) и американской (*E. fuscus*, *E. furinalis*) ветвей, а также *E. isabellinus*, от клады, включающей остальные виды рода; во время второго этапа последняя разделяется на 7-8 линий, соответствующих формам, относимым к *E. serotinus*, *E. bottae*, *E. nilssonii*, *E. gobiensis*.

Тем самым, наши митохондриальные данные поддерживают монофилию палеарктических кожанов, при исключении *E. isabellinus*. По данным дополнительного анализа двух митохондриальных генов (ND1 и *cytb*) ветвь, объединяющая кожанов Нового Света, отделяется несколько раньше других, что было ранее продемонстрировано при использовании других молекулярных маркеров (Stadelmann 2004, Roehrs et al 2010, Roehrs et al. 2011).

Расположение вида *E. nilssonii* внутри основной радиации рода на митохондриальных филогенетических деревьях не согласуется с традиционным пониманием общей морфо-эволюционной тенденции кожанов, выражающейся в большей редукции I² и M³ у более морфологически продвинутых видов. Исходя из большей морфологической дифференциации I² и M³ у *E. nilssonii*, *E. bobrinskoi*/*E. gobiensis*, иногда выделяемых в подрод (или даже род) *Amblyotus*, эти таксоны должны были бы занимать базальное положение на филогенетическом дереве. Более того, для северного кожанка описано факультативное присутствие в зубном ряду малого предкоренного зуба (Крускоп, Фадеева, 2008), что, несомненно, является крайне примитивной чертой в контексте рода *Eptesicus*. Несомненная архаичность морфологического облика кожанков даже заставляла исследователей, не признававших *Amblyotus* в качестве отдельного таксона, выделять их в особую группу видов (напр., Коорман, 1994). Тем не менее, по данным анализа митохондриальных генов положение северного и гобийского кожанков далеко от базального.

Этому можно предложить два объяснения. Первое из них связано с вероятностью древней интрогрессии мтДНК предка *E. serotinus* в геном предка современных *Amblyotus*. Другое объяснение предполагает ошибочность современных представлений о преобладающих тенденциях в эволюции морфологических признаков кожанов.

Филогения рода по ядерным данным и события интрогрессии в эволюции рода.

Ядерные данные противоречат митохондриальной филогении рода и лучше последней соответствуют традиционным взглядам на систематику кожанов, поддерживая существование видового комплекса *E. bottae* s.l. (включая *anatolicus*) и *E. serotinus* s.l. (включая формы *isabellinus* и *andersoni*). Оче-

видные несоответствия митохондриальной и ядерной филогении касаются, во-первых, комплекса видов *E. bottae* (включая *E. anatolicus*) и, во-вторых, положения *E. s. andersoni*.

Положение на митохондриальном дереве видов комплекса *E. bottae* отличается от положения на дереве по яДНК. На дереве по объединенным ядерным генам *E. b. ognevi* объединяется с *E. hottentotus*, в то время как на митохондриальном дереве он ближе к *E. serotinus*. Кроме того, дополнительный анализ данных по гену RAG2 показал, что и другие представители видового комплекса *E. bottae*, включая *E. anatolicus*, объединяются при высоких поддержках. Можно предположить, что в эволюции этого видового комплекса митохондриальный геном был независимо заимствован как минимум трижды.

E. s. andersoni, будучи близким по ядерным данным к *E. serotinus*, по митохондриальным занимает обособленное положение и отличается от *E. serotinus* примерно в той же степени, что от *E. nilssonii* и *E. gobiensis* (~7%). Это так же свидетельствует о возможных интрогрессивных событиях в недавней истории таксона.

Присутствие на дереве по объединенным ядерным генам высоко поддерживаемой клады «*hottentotus/bottae*» и клады, объединяющей *E. isabellinus*, *E. s. serotinus*, *E. s. andersoni* и *E. s. mirza* (последнее обнаруживается в анализе расширенного набора таксонов по гену RAG2), противоречит традиционной трактовке группы видов «*serotinus*» (Simmons 2005; Коорман, 1993): виды комплекса *E. bottae* s.l. следует исключить из него. Вопрос о правомочности выделения подрода *Cnephaeus* Каур, 1829, объединяющего палеарктических кожанов и южно-африканского *E. hottentotus* (Hooper & Van Den Bussche, 2003), остаётся открытым до установления филогенетических отношений между кладами «*hottentotus/bottae*» и «*fuscus*».

Еще одно вероятное противоречие митохондриального и ядерного деревьев касается положения *E. isabellinus*. На митохондриальном дереве положение этого вида не определяется наверняка, однако он оказывается внешней ветвью относительно других палеарктических *Eptesicus*, в то время как по результатам анализа ядерных генов *E. isabellinus* образует сестринскую ветвь к *E. serotinus*, хотя и с низкими поддержками. Для уточнения его филогенетического положения требуется дальнейшее накопление данных по яДНК.

Взаимоотношения *E. isabellinus* и *E. serotinus*

Выявленные зарубежными авторами различия в мтДНК между поздними кожанами Западной Европы и Пиренейского полуострова позволили выделить *E. isabellinus* в качестве самостоятельного вида. Предположение, что и эта форма, и поздние кожаны Европейской части России – популяции одного вида, избежавшие, в отличие от западно-европейских, недавней интрогрессии мтДНК *E. nilssonii*, не подтвердилось (Ibanez et al., 2006). Результаты проведенного нами анализа демонстрируют наличие значимых генетических различий между *E. isabellinus* и *E. serotinus* как из Западной Европы, так и из Европейской части России и Казахстана. Это поддерживает выделе-

ние *E. isabellinus* в качестве отдельного вида и указывает на ошибочность представления о синонимичности *E. s. turcomanus* и *E. s. isabellinus* (Ellerman, Morrison-Scott, 1966).

Положение *E. bobrinskoi* и *E. gobiensis*

Как ядерные, так и митохондриальные данные продемонстрировали отсутствие различий видового уровня между формами *E. gobiensis* и *E. bobrinskoi*. Таким образом, видовая самостоятельность *E. bobrinskoi* нашими данными не подтверждается. Вероятно, кожанка Бобринского следует рассматривать как подвид гобийского кожанка, от которого он отличается более мелкими размерами (Artyushin et al., 2012).

E. bottae

Внутри этого видового комплекса традиционно признается наличие выраженной географической изменчивости (Ellerman, Morrison-Scott, 1966), однако таксономический статус выделяемых форм неоднозначен, в частности, статус формы *anatolicus* недавно был повышен до видового (Mayer et al., 2007). По данным нашего анализа митохондриальной ДНК не только *E. anatolicus* образует далеко отстоящую от других палеарктических кожанов ветвь, но и остальные формы видового комплекса *E. bottae* не составляют монофилетической группы. Выделяется два отчетливых кластера, один из которых образован *E. b. ognevi*, второй — *E. b. hingstoni*, *E. b. innesi*, *E. b. taftanimontis*. Различия между этими двумя группами подвидов достигают видового уровня (р-дистанция 7.7%). По-видимому, статус *E. b. ognevi* должен быть пересмотрен на более обширном материале.

Статус *E. serotinus andersoni*

Восточные формы *E. serotinus*, населяющие Китай (кроме Синдзяня), Корею, север Индокитая, хорошо обособлены от номинативного подвида по данным анализа мтДНК, и, возможно, их таксономический статус при изучении более обширного материала, может быть повышен до видового. В этом случае вид должен получить название *E. andersoni* Dobson, 1871.

Имевшиеся в нашем распоряжении пробы поздних кожанов из Кореи, Тайваня и Лаоса группируются в компактный кластер с низкими внутригрупповыми дистанциями. Однако надёжность группирования *E. s. andersoni* вместе с *E. serotinus* по данным яДНК и относительно низкие внутригрупповые дистанции свидетельствуют об их достаточно недавней дивергенции.

Интрогрессия мтДНК *E. nilssonii* в геном *E. serotinus*

На территории Западной Европы обитают популяции весьма несхожих морфологически видов *E. nilssonii* и *E. serotinus*, при этом крайне слабо различающиеся по мтДНК (1% р-дистанции (Mayer, Helvesen, 2001)). Для объяснения этого предлагались две гипотезы: недавнее видообразование с неполной сортировкой линий и быстрой (относительно накопления генетических различий) морфологической эволюцией, либо интрогрессия мтДНК между *E. nilssonii* и *E. serotinus* (Mayer et al., 2007).

В настоящей работе обнаружено, что территорию Юго-Восточной Европы, Средней и Центральной Азии населяют поздние кожаны с митохондриальными гаплотипами, принадлежащими к особой группе («южная» гаплотипа), которые не родственны гаплотипам *E. nilssonii* и *E. serotinus* из западно-европейских популяций. Гаплотипы «южной» группы отделены от гаплотипов *E. nilssonii* и западно-европейских гаплотипов *E. serotinus* дистанциями, характерными для видового уровня в данной группе (~7.5%). На территории юго-восточной Европы, в Поволжье, на Северном Кавказе и нижнем Дону, распространены гаплотипы «южной» группы; в Брянской области и окрестностях Киева присутствуют гаплотипы обеих групп, западнее известны только гаплотипы сходные с *E. nilssonii*. Анализ ядерной ДНК показывает, что *E. nilssonii* и *E. serotinus* обладают уникальными видоспецифичными пулами аллелей. При этом все популяции Восточной Европы (подвид *E. s. serotinus*) по яДНК крайне сходны и образуют единую группу вне зависимости от преобладающего варианта мтДНК. Таким образом, ядерные гены не поддерживают гипотезу о недавнем разделении *E. nilssonii* и *E. serotinus*. Более вероятной представляется гипотеза интрогрессии мтДНК *E. nilssonii* в популяции *E. serotinus* в результате гибридизации в зоне исторической симпатрии.

По данным анализа мтДНК, западно-европейские формы *E. nilssonii* и *E. serotinus* образуют весьма близкие, но обособленные монофилетичные группы. Можно предположить, что интрогрессия имела место в прошлом, но не продолжается в настоящее время. В пользу этого говорит отсутствие в настоящее время существенного перекрытия тех частей ареалов этих видов, в которых происходит размножение. При этом *E. nilssonii* свойственна выраженная географическая изменчивость — популяции с территории Сибири и Европейские популяции образуют отдельные кластеры с высокой статистической поддержкой. Большое сходство европейского гаплотипа *E. nilssonii* с заимствованным в ходе интрогрессии гаплотипом *E. serotinus* позволяет предположить более раннее разделение форм *E. nilssonii*, чем событие интрогрессии митохондриального генома *E. nilssonii* в популяции *E. serotinus*.

Соответствие распределения маркеров ядерной ДНК границам видов так же не подтверждает гипотезу современной гибридизации между *E. serotinus* и *E. nilssonii*.

Проблема взаимоотношений *E. s. turcomanus* и номинативного подвида

Традиционно считается, что на юге Европейской части России обитают два хорошо дифференцированных подвида позднего кожана (Огнёв 1927): западный *E. s. serotinus* и восточный *E. s. turcomanus* («кожан туркменский» или «туранский»). Между этими формами на основании морфологических и генетических данных предполагается гибридизация (Стрелков, Ильин, 1990; Матвеев, 2002).

Результаты анализа мтДНК показывают, что экземпляры из Астраханской области, Казахстана и Узбекистана, морфологически определенные как *E. s. turcomanus*, не объединяются в общий кластер.

Анализ ядерных маркеров в нашей работе не позволил выявить однозначных различий между *E. serotinus* s.str. и *E. s. turcomanus*, однако, разделение по частотам аллелей и NET-дистанциям популяций *E. serotinus* на «западные» («Украина», «Брянск») и «восточные» («Узбекистан», «Казахстан», «Астрахань»), а так же существование на деревьях по ядерным генам групп, соответствующих тому же делению, указывает на дифференциацию внутри *E. serotinus*. «Восточные» подвыборки *E. serotinus* преимущественно включают в себя зверьков с типичным габитусом *E. s. turcomanus*, «западные» же наоборот — *E. s. serotinus*. В промежуточных по частотам аллелей подвыборках «Краснодар», «Самара», «Волгоград» также доминируют звери схожие по морфологическому описанию с *E. s. serotinus*.

Такая ситуация может быть объяснена двумя различными гипотезами. Согласно первому сценарию диверсификация подвидов *E. serotinus* – это эволюционно недавнее событие и тогда ядерные данные отражают результат неполной сортировки генетических линий, а различия в морфологических признаках — результат быстрой морфологической дифференциации.

Второй сценарий предполагает вторичный контакт двух изолированных в прошлом форм с замещающей интрогрессией мтДНК и образованием клины частот ядерных аллелей. Такой сценарий представляется более вероятным, поскольку хорошо согласуется с низким уровнем различий по мтДНК (0.3% р-дистанция по *cytb*) по сравнению с яДНК (0.3% и 1.6% р-дистанции между географическими подвыборками по TNY и SPTB соответственно).

Филогеография *E. nilssonii*

Разделение с высокими индексами бутстрэпа и умеренными генетическими дистанциями, не достигающими видового уровня, европейской и сибирской форм *E. nilssonii*, позволяет констатировать относительно давнюю дивергенцию и требует пересмотра традиционного объединения этих форм в единый подвид *E. n. nilssonii*.

Ни в одной из проанализированных популяций обе гаплогруппы *E. nilssonii* не встречаются одновременно. Популяции *E. nilssonii*, в которых присутствуют гаплотипы сибирской группы, распространены не только на территории Сибири и на Урале, но и на Европейской части России (Самарская обл.). Такое положение филогеографической границы достаточно необычно для бореальных видов млекопитающих, для которых филогеографические границы сосредоточены обычно к востоку от Урала.

Данные по яДНК на приведённом в этой работе материале не выявляют группировок внутри *E. nilssonii*, что можно трактовать как более низкий уровень дифференциации этого вида, по сравнению с *E. serotinus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондриальные данные успешно используются как инструмент для предварительной оценки видового разнообразия для многих групп рукокрылых и позволяют выдвигать гипотезы относительно филогенетической истории и систематики этих групп. Однако целый ряд процессов и в частности возможность интрогрессивной гибридизации приводят к несоответствию геногенеалогии мтДНК истинной генеалогии для некоторых групп. Наше исследование показывает, что в эволюции рода *Eptesicus* интрогрессивные процессы происходили многократно и привели к несоответствию ядерной и митохондриальной генеалогии. Вместе с тем митохондриальные данные оказались безусловно полезными для инвентаризации разнообразия (в случае с *E. bobrinskoi*, *E. anatolicus* и *E. isabellinus*) и поиска направлений для пересмотра систематики рода. Филогенетические отношения между найденными на ядерном дереве пятью группами не являются разрешёнными, отчасти вследствие достаточно быстрого разделения некоторых из этих линий за короткий промежуток времени в период базальной радиации рода, отчасти по причине недостаточного количества данных по яДНК. Увеличение объёма ядерных данных позволит уточнить эволюционную историю рода и определить более точно число и порядок событий интрогрессии.

ВЫВОДЫ

1. Полученные молекулярные данные поддерживают выделение следующих Палеарктических видов рода *Eptesicus*: *E. nilssonii*, *E. serotinus*, *E. bottae*, *E. gobiensis*, *E. isabellinus*, *E. anatolicus*. Таксономический статус хорошо дифференцированных по мтДНК форм *E. bottae ognevi* и *E. s. anderssoni* подлежит ревизии на более обширном материале. Видовая самостоятельность *E. bobrinskoi* не подтверждается, эту форму следует рассматривать в качестве подвида *E. gobiensis*.
2. Относительная генетическая близость *E. s. serotinus* и *E. s. turcomanus* объясняется потоком генов при вторичном контакте либо недавней дифференциацией, которая ещё не привела к накоплению различий в мтДНК. Независимо от принимаемой гипотезы, возведение *E. s. turcomanus* в ранг вида не оправдано.
3. Существуют достоверные различия по мтДНК между популяциями *E. nilssonii* с территории Сибири и Европы, не достигающие, тем не менее, видового уровня. С помощью использованных ядерных маркеров эта дифференциация не выявлена.
4. Сходство мтДНК популяций *E. serotinus* из Западной и Центральной Европы с мтДНК *E. nilssonii* - следствие исторической интрогрессии митохондриальных гаплотипов *E. nilssonii* в популяции западноевропейских *E. serotinus*. Дивергенция европейской и азиатской гаплогрупп *E.*

nilssonii, по-видимому, предшествовала событию интрогрессии мтДНК *E. nilssonii* в популяции *E. serotinus*.

5. В роде *Eptesicus* существуют 5 филогенетических линий: линия включающая кожанов Нового Света, а так же представителей рода *Histiotus*; линия «hottentotus/bottae» (*E. hottentotus*, комплекс *E. bottae*, включая *E. anatolicus*); линия «serotinus» (*E. serotinus* ssp., включая *E. s. andersoni*, *E. isabellinus*); линия «gobiensis» (*E. gobiensis*, включая *E. bobrinskoi*); линия «nilssonii» (*E. nilssonii*). Эти данные не указывают на обособленное положение мелких архаичных форм *E. nilssoni* и *E. gobiensis* (подрод *Amblyotus*).

6. Филогенетическая схема, построенная по данным анализа мтДНК некорректно отражает генеологические связи внутри рода *Eptesicus*, вследствие неоднократных событий интрогрессии митохондриального генома, сопровождавших эволюцию этой группы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор глубоко признателен всем, кто поддерживал меня и помогал при выполнении этой работы: моим научным руководителям и учителям — Анне Андреевне Банниковой, Сергею Вадимовичу Крускопу; Лебедеву Владимиру Святославовичу за консультации и неоценимую методическую помощь; Бакулинской Ирине Юрьевне за рецензирование предварительной версии работы; Борисенко Алексею Владимировичу, Росиной Валентине Владимировне, Матвееву Виталию Александровичу, Голенко Анне Сергеевне, Смирнову Дмитрию Григорьевичу за любезно предоставленные образцы тканей кожанов; коллегам по кабинету молекулярных методов кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ; коллективу стационара «Мирное» ИПЭЭ им. А.Н. Северцова; родственникам и друзьям, которые оказывали моральную, материальную и деятельную поддержку при сборе материала и написании работы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК и других изданиях

Artyushin I. V., Bannikova A. A., Lebedev V. S. and Krusko S. V. Mitochondrial DNA relationships among North Palearctic *Eptesicus* (Vespertilionidae, Chiroptera) and past hybridization between Common Serotine and Northern Bat. // *Zootaxa* 2262: 40-52, 2009.

Artyushin I. V., Lebedev V. S., Smirnov D. G., and Krusko S. V. 2012. Taxonomic position of the Bobrinski's serotine (*Eptesicus bobrinskoi*, Vespertilionidae, Chiroptera). *Acta Chiropterologica*, 14(2), 291-303.

Artyushin I., Lebedev V., Bannikova A. and Krusko S. 2012. A molecular reappraisal of the taxonomic status of *Eptesicus serotinus turcomanus* // *Vespertilio* 16: 31–42.

Тезисы конференций

И.В. Артюшин, А.А. Банникова, В.С. Лебедев, С.В. Крускоп, 2009. Следы гибридизации между *E. serotinus* и *E. nilssonii* и родственные взаимоотношения палеарктических видов кожанов по данным митохондриальной ДНК // Современные проблемы зоо- и филогеографии млекопитающих: мат. Всерос. научной конференции Пенза: ПГПУ. С 8.

С.В. Крускоп, **И.В. Артюшин**, 2010. Молекулы и морфология в систематике рукокрылых: расхождение во взглядах // Целостность вида у млекопитающих (изолирующие барьеры и гибридизация) (Петергоф: 2010) Материалы конференции. М.: Товарищество научных изданий КМК. С 46.

И.В. Артюшин, А.А. Банникова, С.В. Крускоп, В.С. Лебедев, 2011. Кожаны рода *Eptesicus* (Vespertilionidae) Северной Палеарктики: молекулярная систематика и филогеография // териофауна России и сопредельных территорий. Международное совещание (IX Съезд Териологического общества при РАН). М.: Товарищество научных изданий КМК. С 29.

Artyushin I., Bannikova A., Lebedev V., Krusko S., Mitochondrial DNA Relationships among North Palearctic *Eptesicus* species // 15th IRBC - the Conference Manual. Prague, Czech. 2010. P 90.

Artyushin I., Bannikova A., Lebedev V., Krusko S., North palearctic serotines, molecular study // VIth European Congress of Mammalogy (Abstract volume). Paris, France. 2011. P 77.